



(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **92102197.8**

(51) Int. Cl.5: **C12N 15/62, A61K 47/48,
C12N 15/56, C12P 21/08**

(22) Anmeldetag: **10.02.92**

(30) Priorität: **28.02.91 DE 4106389**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.09.92 Patentblatt 92/36

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT
SE**

(71) Anmelder: **BEHRINGWERKE
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
W-3550 Marburg 1(DE)**

(72) Erfinder: **Seemann, Gerhard
Weissdornweg 32
W-3550 Marburg-Einhhausen(DE)
Erfinder: Bosslet, Klaus
Am Schlag 5
W-3550 Marburg(DE)
Erfinder: Czech, Jörg
Höhenweg 3
W-3550 Marburg(DE)
Erfinder: Kolar, Cenek
Deutschhausstrasse 20
W-3550 Marburg(DE)
Erfinder: Hoffmann, Dieter
Feuerdornweg 12
W-3550 Marburg-Einhhausen(DE)
Erfinder: Sedlacek, Hans-Harald
Sonnenhang 3
W-3550 Marburg(DE)**

(54) **Monoklonalantikörper, Linker- und Beta-Glucuronidase enthaltende Fusionsproteine zur
Prodrug-Aktivierung, ihre Herstellung und Verwendung.**

(57) Die Erfindung betrifft Fusionsproteine für die Prodrug-Aktivierung der allgemeinen Formel huTuMAK-L- β -Gluc, wobei huTuMAK für einen humanisierten oder humanen tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment davon steht, L einen Linker bedeutet und β -Gluc humane β -Glucuronidase beinhaltet. Diese Fusionsproteine werden gentechnisch hergestellt. huTuMAK sorgt für die spezifische Lokalisation von Tumoren, L verbindet huTuMAK mit β -Gluc in einer Weise, welche die spezifischen Eigenschaften beider Fusionspartner nicht behindert und β -Gluc aktiviert eine geeignete Prodrug-Verbindung durch Abspaltung von Glucuronsäure, wobei durch die humanisierten bzw. humanen Fusionspartner ein nahezu autologes System zur Anwendung im Menschen bereitsteht.

EP 0 501 215 A2

Die Erfindung betrifft Fusionsproteine für die Prodrug-Aktivierung der allgemeinen Formel huTuMAK-L- β -Gluc, wobei huTuMAK für einen humanisierten oder humanen tumorspezifischen monoklonalen Antikörper, ein Fragment oder ein Derivat davon steht, L einen Linker bedeutet und β -Gluc humane β -Glucuronidase beinhaltet. Diese Fusionsproteine werden gentechnisch hergestellt. huTuMAK sorgt für die spezifische 5 Lokalisation von Tumoren, L verbindet huTuMAK mit β -Gluc in einer Weise, welche die spezifischen Eigenschaften beider Fusionspartner nicht behindert und β -Gluc aktiviert eine geeignete Prodrug-Verbindung durch Abspaltung von Glucuronsäure, wobei durch die humanisierten bzw. humanen Fusionspartner ein nahezu autologes System zur Anwendung im Menschen bereitsteht.

Die Kombination von Prodrug und tumorspezifischen Antikörper-Enzym-Konjugaten zur Anwendung als 10 therapeutische Mittel ist in der Fachliteratur beschrieben. Hierbei wurden gegen bestimmtes Gewebe gerichtete Antikörper, an die ein Prodrug-spaltendes Enzym kovalent gebunden sind, einem Tier, welches das transplantierte Gewebe enthält, injiziert, und anschließend wird eine Enzym-aktivierbare Prodrug-Verbindung verabreicht. Unter der Einwirkung des am Gewebe verankerten Antikörper-Enzym-Konjugates wird die Prodrug-Verbindung zum Zellgift umgewandelt, das eine zytotoxische Wirkung gegen das transplantierte Gewebe ausübt.

In WO 88/07378 ist ein zwei Komponenten enthaltendes therapeutisches System, bestehend aus einer 15 Antikörper-Enzym-Komponente beschrieben. Zur Herstellung der Antikörper-Enzym-Konjugate wird hierbei die Verwendung von Nicht-Säuger-Enzymen beschrieben und die von endogenen Enzymen aufgrund der unspezifischen Wirkstoff-Freisetzung ausgeschlossen. Da die exogenen Enzyme von dem Organismus als 20 Fremdantigene erkannt werden, ist deren Verwendung mit dem Nachteil einer Immunantwort gegenüber diesen nicht körpereigenen Stoffen verbunden, aufgrund deren das am Antikörper immobilisierte Enzym desaktiviert und gegebenenfalls das ganze Konjugat eliminiert wird. Weiterhin werden hier p-Bis-N-(2-chlorethyl)-aminobenzylglutaminsäure und deren Derivate als Prodrug verwendet, deren chemische Halbwertzeit nur 5,3 bis 16,5 Stunden beträgt. Die chemische Instabilität einer Prodrug-Verbindung ist aufgrund 25 der zu erwartenden Nebenwirkungen von Nachteil.

In EP A2-0 302 473 wird ebenfalls ein zwei Komponenten enthaltendes therapeutisches System beschrieben, in dem das am Tumorgewebe lokalisierte Antikörper-Enzym-Konjugat eine Prodrug-Verbindung zu einem zytotoxischen Wirkstoff spaltet. Die hierbei unter anderem beschriebene kombinierte 30 Verwendung von Etoposid-4'-phosphat und deren Derivaten als Prodrug und antikörperimmobilisierten alkalischen Phosphatasen zur Freisetzung der Etoposide ist aufgrund der starken Präsenz von endogenen 35 alkalischen Phosphatasen im Serum von Nachteil. Wie in DE A1-38 26 562 beschrieben, werden bereits die Etoposid-4'-phosphate alleinig als therapeutisches Antitumormittel angewandt, wobei die im Serum präsenten Phosphatasen das Etoposid aus dem Prodrugs freisetzen.

Es wurde gefunden, daß huTuMAK's gekoppelt über L an β -Gluc und gentechnisch hergestellt ein 35 besonders vorteilhaftes, da nahezu autologes System darstellen. Zusätzlich wurde gefunden, daß die katalytische Aktivität der β -Gluc im Fusionsprotein bei pH 7.4 (d. h. physiologischen Bedingungen) signifikant höher ist als die des nativen Enzyms, wenn das Fusionsprotein über die V-Region an das 40 Antigen gebunden ist. Ferner läßt sich ein Fusionsprotein mit nur einer Hinge Region (siehe Fig. P und Beispiel O) gentechnisch mit hoher Ausbeute erzeugen, da die Hauptmenge des gebildeten Produkts als eine Bande (hier mit Molekulargewicht 125 000) anfällt und per Affinitätschromatographie über anti-idiotypische MAK bzw. Anti-Glucuronidase- MAK leicht zu reinigen ist.

Ferner wurde gefunden, daß eine chemische Modifizierung der Fusionsproteine, insbesondere eine teilweise oder vollständige Oxidation der Kohlenhydratstrukturen vorzugsweise mit einer nachfolgenden 45 reduktiven Aminierung zu einer verlängerten Halbwertszeit führt. Eine enzymatische Behandlung der erfindungsgemäßen Fusionsproteine mit alkalischer Phosphatase aus z. B. Rinderdarm oder E. coli führte im allgemeinen zu keiner signifikanten Verlängerung der Halbwertszeit.

Die Erfindung betrifft folglich Fusionsproteine der Formel

huTuMAK-L- β -Gluc (I) 50
wobei huTuMAK einen humanisierten oder humanen tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment oder ein Derivat davon bedeutet, und bevorzugt die in der EP-A1-0 388 914 beschriebenen MAK umfaßt.

Besonders bevorzugt ist das humanisierte MAK Fragment mit den V_L und V_H Genen gemäß Tabelle 3 in 55 den erfindungsgemäßen Fusionsproteinen enthalten.

Tab. 3

431/26 VH hum

5

	10	30	50
	caactgcaggagagcggtccaggtctgtgagacctagccagaccctgaggcctgaccctgc		
	GlnIleGlnGluSerGlyProGlyLeuValArgProSerGlnThrLeuSerLeuThrCys		
10	70	90	110
	accgtgtctgcttcaccatcagcagtggatatacgactggcactgggtgagacagccacct		
	ThrValSerGlyPheThrIleSerSerGlyTyrSerTrpHisTrpValArgGlnProPro		
	130	150	170
	ggacgaggtcttgagtggattggatacatacatcagtggtatcactaactacaacccc		
15	GlyArgGlyLeuGluTrpIleGlyTyrIleGlnTyrSerGlyIleThrAsnTyrAsnPro		
	190	210	230
	tctctcaaaagttagagtgacaatgctggtagacaccagcaagaaccaggctcagcgtgaga		
	SerLeuLysSerArgValThrMetLeuValAspThrSerLysAsnGlnPheSerLeuArg		
20	250	270	290
	ctcagcagcgtgacagccggccgacaccggcggtctattattgtgcaagagaagactatgat		
	LeuSerSerValThrAlaAlaAspThrAlaValTyrTyrCysAlaArgGluAspTyrAsp		
	310	330	350
25	taccaactggtaacttcgatgtctgggtcaaggcaggcctcgtcacagtctcctca		
	TyrHisTrpTyrPheAspValTrpGlyGlnGlySerLeuValThrValSerSer		

431/26 VK hum

	10	30	50
	ggtgtccactccgacatccagatgaccagccagagccaaaggcgcctgagcgccagcgtgggt		
	GlyValHisSerAspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSerValGly		
35	70	90	110
	gacagagtgaccatcacctgttagtaccagctcgagtgtaatgttacatgactggtaccag		
	AspArgValThrIleThrCysSerThrSerSerValSerTyrMetHisTrpTyrGln		
	130	150	170
40	cagaagccaggttaaggctccaaagctgctgtatctacagcacatccaaacctggcttctgg		
	GlnLysProGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrSerThrSerAsnLeuAlaSerGly		
	190	210	230
	gtgccaaggcagattcagcggtacgcgttaccgacttacacccatcagcag		
	ValProSerArgPheSerGlySerGlyThrAspPheThrPheThrIleSerSer		
45	250	270	290
	ctccagccagaggacatgccacactactactgcccacatcagtggagttagttatcccacgttc		
	LeuGlnProGluAspIleAlaThrTyrCysHisGlnTrpSerSerTyrProThrPhe		
	310	330	
50	ggccaagggaccaagggtggaaatcaaacgt		
	GlyGlnGlyThrLysValGluIleLysArg		

L bedeutet Linker und enthält vorzugsweise eine Hinge-Region eines Immunglobulins, die über eine Peptidsequenz mit dem N-Terminus des reifen Enzyms verbunden ist.

55 β -Gluc bedeutet die vollständige Aminosäuresequenz der humanen β -Glucuronidase bzw. in den zugehörigen Gen-Konstrukten die vollständige cDNA (Oshima A. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84, (1987) 685-689).

Bevorzugt sind ferner Konstrukte mit einem CH₁-Exon und einem Hinge-Exon im Antikörperteil,

besonders bevorzugt sind Konstrukte, in denen diese Teile aus einem humanen IgG3 C-Gen stammen. Am meisten bevorzugt sind Konstrukte, gemäß Beispiel (I), wobei die entsprechende leichte Kette des humanisierten TuMAK's coexprimiert wird, um so einen in den Bindungseigenschaften des ursprünglichen TuMAK's möglichst gleichen huTuMAK-Anteil zu erhalten. Die Erfindung betrifft schließlich Verfahren für die gentechnische Herstellung vorgenannter Fusionsproteine, ihre Reinigung sowie ihre Verwendung als Arzneimittel. Fusionsproteine wie beschrieben können zur Prodrug-Aktivierung bei Tumorerkrankungen eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen Fusionsproteine chemisch modifiziert, um eine verlängerte Halbwertszeit und somit eine verbesserte Lokalisation von Tumoren zu erreichen. Vorzugsweise werden die Fusionsproteine mit einem Oxidationsmittel, z. B. Periodat, behandelt, was im allgemeinen zu einer teilweisen oder vollständigen Spaltung der Kohlenhydratringe und somit zu einer Veränderung der Kohlenhydratstruktur führt. Diese Veränderung führt im allgemeinen zu einer verlängerten Halbwertszeit. Weiterhin ist es vorteilhaft in einem zweiten Reaktionsschritt bestehende Aldehydgruppen zu derivatisieren, beispielsweise durch reduktive Aminierung. Die teilweise oder vollständige Zerstörung der Aldehydgruppen führt im allgemeinen zu einer Reduzierung möglicher Nebenreaktionen mit beispielsweise Plasmaproteinen. Demzufolge ist es vorteilhaft, die erfindungsgemäßen Fusionsproteine in einen ersten Reaktionsschritt beispielsweise mit Periodat zu oxidieren und in einem zweiten Reaktionsschritt beispielsweise mit Ethanalamin und Cyanoborhydrid reduktiv zu aminieren.

Die nachfolgenden Beispiele beschreiben die gentechnische Synthese eines besonders bevorzugten erfindungsgemäßen Fusionsproteins, deren Derivatisierung sowie den Nachweis der Funktionsfähigkeit beider Fusionspartner.

Beispiel (A):

Ausgangsmaterial war das Plasmid pGEM4-HUGP13 (Fig. A). pGEM4-HUGP13 enthält ein cDNA Insert, welches die vollständige kodierende Sequenz für das Enzym humane β -Glucuronidase enthält (Oshima et al. a.a.O.). Alle verwendeten Techniken wurden Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor USA (1989) entnommen.

Beispiel (B):

Das Plasmid pGEM4-HUGP13 wurde mit den Restriktionsendonukleasen Pst1 und Sal1 geschnitten und das 342bp lange Pst1/Sal1 Fragment, welches die NotI Restriktionsschnittstelle trägt, isoliert. Das Pst1/Sal1 Fragment wurde in den Pst1/Sal1 gespaltenen Vektor pTZ (Fig. B.1) kloniert und der Klon pTZ β Glc350 isoliert (Fig. B.2).

Beispiel (C):

Der Plasmidklon pTZ β Glc350 wurde mit Pst1 gespalten und das doppelsträngige DNA-Fragment β Glc Linker, welches aus den Oligonukleotiden β Glc Linker 1 und β Glc Linker 2 besteht (Tab. 1) und kohäsive Pst1 Enden besitzt, in die geöffnete Pst1 Schnittstelle ligiert.

50

55

Tab. 1

5

BGlc Linker 1:

5' GCG GCG GCG GCG GTG CA 3'

15

BGlc Linker 2:

30

5' CCG CCG CCG CCG CTG CA 3'

25 Es wurde der Klon pTZ β Glc370 isoliert, bei dem das β -Glucuronidase Fragment an seinem 5' Ende um das Oligonukleotid I verlängert ist und das die vorher vorhandene Pst1 Schnittstelle verloren, dafür aber an seinem 5' Ende eine neue Pst1 Schnittstelle erhalten hat

Beispiel (D):

Der Plasmidklon pTZ β Glc370 wurde mit Pst1 gespalten und mit dem aus den Hinge-Oligonukleotiden 1 und 2b bestehenden Hinge-Linker-Fragment (Tab. 2), welches zwei kohäsive Pst1 Enden besitzt, ligiert. Dabei wird die Pst1 Schnittstelle am 5' Endes des β Glc370 Fragmentes zerstört. Es wurde der Plasmidklon pTZ β Glc420 isoliert, bei dem das β Glc Insert am 5' Ende um den Hinge-Linker H verlängert ist (Fig. D).

25

Tab. 2

18

Hinge 1 oligo:

5'

GAG CCC AAA TCT TGT GAC ACA CCT CCC CCG TGC CCA
3'
CGG TGC CCA GTT GCA

45

Hinge 2b oligo:

50

51

ACT GGG CAC CGT GGG CAC GGG GGA GGT GTG TCA CAA
3'
GAT TTG GGC TCT GCA

Beispiel (E):

Das Plasmid pTZ β Glc420 wurde mit Pst1 und Sal1 gespalten und das 420bp Insert isoliert. Das Plasmid IgG3c F(ab') $_2$ 2H (EP-A2-O 352 761, Fig. 3, *ibidem*), welches das CH $_1$ Exon und zwei Einge Exons eines humanen IgG3 C-Gens enthält, wurde vollständig mit Sal1 und partiell mit Pst1 gespalten. Mit diesem Sall/Pst1(part.) gespaltenen Plasmid wurde das isolierte 420bp Insert ligiert und der Plasmidklon isoliert, der das CH $_1$ Exon, ein Hinge Exon und das β Glc420 Fragment enthält, zwischen CH $_1$ Exon und β -Glucuronidase also die genetische Information zweier Hinge Exons trägt (pUC CH $_1$ + H + β Glc420) (Fig. E).

10 **Beispiel (F):**

Das Plasmid pGEM4-HUGP13 β Glc wurde mit Sall gespalten und das 1750bp Sall-Fragment aus der β -Glucuronidase cDNA isoliert. Das isolierte 1750bp Sall-Fragment wurde mit dem Sall-gespaltenen Plasmid pUC CH $_1$ + H + β Glc430 ligiert. Es wurde der Plasmidklon pUC CH $_1$ / β Glc isoliert, der ein Fusionsgen aus einem CH $_1$ Exon, einem Hinge Exon und einem Fusionsexon zwischen einem Hinge Exon und der humanen β -Glucuronidase cDNA enthält (Fig. F).

Beispiel (G):

20 Der Expressionsvektor pABstop (Fig. I.1) wurde mit HindIII und Sal1 gespalten. Das Plasmid pUC CH $_1$ + H + Hu β Glc wurde mit HindIII vollständig und mit Sal1 partiell gespalten und das CH $_1$ + H + hu β Glc Insert isoliert. Das CH $_1$ + H + hu β Glc Insert wurde mit dem HindIII/ Sal1-gespaltenen pABstop ligiert und der Klon pABstop CH $_1$ + H + hu β Glc isoliert (Fig. G).

25 **Beispiel (H):**

Der pABstop Vektor pABstop BW 431/26 hum V $_H$, der die humanisierte Version des V $_H$ -Gens des anti CEA MAK BW 431/26 (Bosslet K. et al., *Eur.J.Nucl.Med.* 14, (1988) 523-528) enthält (Sequenzen des humanisierten V $_H$ - und V $_K$ -Gens siehe Tab. 3), wurde mit HindIII und BamH1 gespalten und das Insert, 30 welches das Signalexon und das V $_H$ -Exon enthält, isoliert. Der Plasmidklon pABStop CH $_1$ + H + hu β Glc wurde mit HindIII gespalten und mit den HindIII/BamH1 431/26 hum V $_H$ -Fragment ligiert. Nach 2 h Ligation bei Raumtemperatur wurde die Ligation durch 10' Inkubation bei 70° C gestoppt, die noch freien Enden mit Klenow Polymerase und dNTPs aufgefüllt. Dann wurde über Nacht weiterligiert. Nach Transformation wurde mit Hilfe von Restriktionskartierung und Nukleinsäuresequenzanalyse der Klon β ABStop 431/26 hum V $_H$ 35 hu β Glc1H isoliert, der ein Immunglobulin F(ab') $_2$ Gen mit einem Hinge-Exon enthält, das mit dem kodierenden Bereich der humanen β -Glucuronidase fusioniert ist (Fig. H).

Beispiel (I):

40 Der Klon pABStop 431/26 hum V $_H$ hu β Glc1H wurde zusammen mit einem Plasmidklon, der die leichte Kette des humanisierten BW 431/26 trägt (Fig. J) und zwei Plasmiden, die ein Neomycin- (Fig. K) bzw. ein Methotrexat-Resistenzgen (Fig. L) tragen, in BHK Zellen transfiziert. Es wurde ein Fusionsprotein ausgeprägt, das sowohl die Antigenbindungeigenschaften des MAK BW 431/26hum als auch die enzymatische Aktivität der humanen β -Glucuronidase hat.

45 **Beispiel J:****Nachweis der Antigenbindungeigenschaften und der enzymatischen Aktivität des 431/26hum V $_H$ hu β Glc 1H Fusionsproteins**

50 Die Fähigkeit des 431/26hum V $_H$ hu β Glc 1H Fusionsproteins spezifisch an das durch den 431/26 definierte Epitop auf CEA (Carcinoembryonic Antigen) zu binden und gleichzeitig die enzymatische Aktivität der humanen β -Glucuronidase auszuüben, wurde in einem Spezifitäts-Enzymaktivitätstest bestimmt. Dieser Test wird wie im folgenden

55 beschrieben durchgeführt:

- Polystyrol (96 well) Mikrotitrationsplatten (U-Form, Typ B, Fa. Nunc, Best.-Nr. 4-60445) werden mit gereinigtem CEA (1-5 μ g CEA/ml, hiervon 75 μ l/Vertiefung) oder mit GIT-Mucin (gleiche Menge wie CEA) über Nacht bei R.T. inkubiert.

- Das nicht adsorbierte Antigen wird abgesaugt und 3x mit 0.05 M Tris-Citrat-Puffer, pH 7.4, gewaschen.
- Die Mikrotitrationsplatten werden über Nacht mit der Öffnung nach unten auf Zellstoff bei R.T. stehen gelassen.
- 5 - Die Mikrotitrationsplatten werden 30 Minuten bei 20 °C mit 250 µl 1%iger Caseinlösung in PBS, pH 7.2 /well inkubiert (Blockierungslösung).
- Während des Blockierens wird das Substrat angesetzt. Die Menge des Substrates richtet sich nach der Zahl der zu testenden Überstände. Das Substrat wird für jeden Test frisch angesetzt.
- 10 Substrat: 4-Methylumbelliferyl β -D-Glucuronide (Best.-Nr.: M-9130 bei Fa. Sigma), 2.5 mM in 200 mM NaAcetatpuffer, pH 5.0, mit 0.01 % BSA
- Die Blockierungslösung wird abgesaugt und je 50 µl BHK-Zellüberstand, welcher das Fusionsprotein enthält, wird auf die mit CEA- bzw. GIT-Mucin gecoatete Mikrotitrationsplatte aufgetragen (benötigtes Probenvolumen also mindestens 120 µl).
- Anschließend wird 30 Minuten bei R.T. inkubiert.
- 15 - Die Platten werden 3x mit ELISA-Waschpuffer (Behring, OSEW 96) gewaschen.
- Das Substrat wird aufgetragen (50 µl/well) und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Wegen möglicher Verdunstung wird die Platte abgedeckt.
- Nach 2 Stunden werden 150 µl Stopplösung/well pipettiert (Stopplösung = 0,2 M Glycin + 0,2 % SDS, pH 11.7).
- 20 - Die Auswertung kann nun unter einer UV-Lampe (Anregungsenergie 380 nm) oder in einem Fluoreszenzmessgerät. (Fluoroscan II, ICM- Biomedicals, Kat-Nr.: 78-611-00) erfolgen.

Mittels dieses Spezifitäts-Enzymaktivitätstests konnte gezeigt werden, daß in den mit CEA beschichteten Vertiefungen ("wells") fluoreszierendes 4-Methylumbelliferyl nachzuweisen war, wenn die Enzymaktivität bei pH 5, dem katalytischen Optimum, bestimmt wurde (Tab.4).

25

Tabelle 4

Ausverdünnung von Fusionsproteinzellkulturüberstand (B73/2) auf CEA und GIT Mucin				
30	Verdünnungsstufen	Substrat in unterschiedlichen Lösungen		
		0.2 M Natriumacetatpuffer + 0.01 % BSA, pH 5, auf CEA	PBS, pH 7.2 auf CEA	PBS, pH 7.2 auf GIT Mucin
35	konzentriert	9118	2725	115,7
	1:2	7678	2141	93,37
	1:4	4662	1195	73,39
	1:8	2927	618,5	60,68
	1:16	1657	332,1	53,69
	1:32	853	168,2	40,44
40	1:64	425	99,26	48,21
	1:128	192,5	57,89	47,48

45 Eine Bestimmung der Umsatzrate bei pH 7.2 ergab, daß das Fusionsprotein bei diesem physiologischen pH noch \approx 25 % der Umsatzrate bei pH 5 zeigte. Auf den mit GIT-Mucin gecoateten und bei pH 5 vermessenen Negativkontrollplatten konnte keine signifikante Methylumbelliferylfreisetzung gemessen werden.

Dieser Befund zeigt, daß die humanisierte V-Region des 431/26hum $V_Hhu\beta Glic$ 1H Fusionsproteins ihre Epitopspezifität behalten hat und der β -Glucuronidaseanteil des Fusionsproteins in der Lage ist, ähnlich wie das menschliche native Enzym, das β -Glucuronid des 4-Methylumbelliferyls zu spalten.

50

Beispiel K:

Nachweis der funktionellen Identität der V-Region des 431/26hum $V_Hhu\beta Glic$ 1H Fusionsproteins mit der des humanisierten MAK BW 431/26 und der des murinen MAK BW 431/26

55 Im Beispiel J wurde gezeigt, daß das 431/26hum $V_Hhu\beta Glic$ 1H Fusionsprotein ein gewisses CEA-Bindungspotential sowie β -Glucuronidaseaktivität besitzt. Der im folgenden beschriebene antigenspezifische Kompetitionstest macht eine Aussage über die Identität der CEA-Epitope, die von den kompetitierenden

Molekülen erkannt werden sowie über die Interaktionsstärke der Epitop-Fusionsprotein- bzw. Epitop-Antikörper-Reaktion.

Dieser Test wird wie im folgenden beschrieben durchgeführt:

- Polystyrol 96 well Mikrotitrationsplatten (U-Form, Typ B, Fa. Nunc, gest.-Nr.: 4-60445) werden mit gereinigtem CEA (1-5 µg CEA/ml, hiervon 75 µl/well) oder mit GIT-Mucin (gleiche Menge wie CEA) über Nacht bei R.T. inkubiert.
- Das nicht adsorbierte Antigen wird abgesaugt und 3x mit 0.05 M Tris-Citrat-Puffer, pH 7.4, gewaschen.
- Die Mikrotitrationsplatten werden über Nacht mit der Öffnung nach unten auf Zellstoff bei R.T. stehen gelassen.
- Die Mikrotitrationsplatten werden 30 Minuten bei R.T. mit 250 µl 1%iger Caseinlösung in PBS, pH 7.2 /well inkubiert (Blockierungslösung).
- 50 µl des MAK BW 431/26 in einer Konzentration von 5 ng/ml werden mit 50 µl 10fach konzentriertem Überstand des humanisierten MAK BW 431/26 bzw. des Fusionsproteins sowie serieller 2x-Verdünnungen gemischt.
- Von diesen Mischungen werden 50 µl Aliquots in die wells der mit CEA- bzw. GIT-Mucin gecoateten Mikrotitrationsplatten pipettiert.
- Die Mikrotitrationsplatten werden für 30 Minuten bei R.T. inkubiert.
- Anschließend werden die Platten 3x mit ELISA-Waschpuffer (Fa. Behringwerke AG, Best.-Nr. OSEW 96, 250 µl) gewaschen.
- Anschließend werden 50 µl eines 1:250 verdünnten Ziege anti Maus Ig Antikörpers, welcher mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist (Southern Biotechnology Associates, Best.-Nr.: 1010-04), zugegeben.
- Nach 30 Minuten Inkubation bei R.T. und 3maligem Waschen wird die Substrataktion wie folgt durchgeführt:
- 30 µl pro well NADP 0,1 mM zugeben (7,65 mg lösen in 100 ml 20 mM Tris; 0,1 mM MgSO₄, pH 9.5); die Lösung kann bei -20° C mehrere Monate gelagert werden.
- 30 Minuten bei R.T. inkubieren.
- Während der Inkubation mit NADP das Verstärkersystem ansetzen: (5 ml pro Platte)
- 2 Teile INT (2,5 mg/ml mit 30%igem Ethanol im Ultraschallbad lösen; immer frisch ansetzen)
+ 1 Teil PBS, pH 7.2
- + 1 Teil Diaphorase (1 mg/ml PBS, pH 7.2)
- + 1 Teil ADH (0,5 mg/ml PBS, pH 7.2)
- 50 µl des Verstärkersystems zugeben
- bei gewünschter Reaktionsstärke die Reaktion mit 0,1 N H₂SO₄ 100 µl pro well abstoppen
- bei 492 nm im TITERTEK^R MULTISCAN messen (Blankwert = 50 µl NADP + 50 µl Verstärkerlösung + 100 µl 0,1 H₂SO₄)

NADP - Fa. Sigma, Best.-Nr. N-0505
INT - Fa. Sigma, Best.-Nr. I-8377
40 ADH - Fa. Sigma, Best.-Nr. A-3263
Diaphorase - Fa. Sigma, Best.-Nr. D-2381

In diesem antigenspezifischen Kompetitionstest bedeutet die Reduktion der Extinktion eine Kompetition der miteinander kompetitierenden Moleküle um das gleiche oder räumlich sehr nahe zusammenliegende Epitope.

45 Die erhaltenen Inhibitionsdaten zeigen, daß sowohl das Fusionsprotein 431/26hum V_Hhu_βGlc 1H als auch der humanisierte MAK 431/26 die Bindung des murinen MAK BW 431/26 an sein CEA-Epitop blockieren. Eine Inhibition von 50 % wird bei einem 200molaren Überschuß der entsprechenden Kompetitorien erreicht. Hieraus ist zu folgern, daß die Avidität des Fusionsproteins zu dem CEA-Epitop vergleichbar ist mit der des humanisierten MAK 431/26. Desweiteren bindet das Fusionsprotein und der humanisierte MAK an das gleiche bzw. ein räumlich dem durch den murinen MAK BW 431/26 auf CEA definierten Epitop sehr nahe liegendes Epitop.

Beispiel L:

55 **Nachweis der Gewebespezifität des 431/26hum V_Hhu_βGlc 2H Fusionsproteins**

In Beispiel J wurde unter anderem gezeigt, daß das 431/26hum V_Hhu_βGlc 1H Fusionsprotein an gereinigtes CEA binden kann.

In Beispiel K wurde gezeigt, daß die V-Region des Fusionsproteins in der Lage ist, mit der V-Region des murinen BW 431/26 um das gleiche oder ein sehr naheliegendes Epitop zu kompetitieren. Mit Hilfe des im folgenden beschriebenen indirekten für β -Glucuronidase spezifischen immunhistochemischen Tests kann die Feinspezifität des Fusionsproteins auf kryopräservierten Geweben ermittelt werden.

5 Der Test ist im folgenden beschrieben:

- 6 μm dicke Gefrierschnitte werden auf Objekträger aufgezogen und mindestens 30 Minuten luftgetrocknet.
- Anschließend werden die Objekträger 10 Sekunden in -20° C kaltem Aceton fixiert.
- Die Objekträger werden 5 Minuten in Tris/NaCl-Waschpuffer, pH 7.4, mit 0,1 % BSA gewaschen.
- 10 - 20-100 μl Fusionsprotein enthaltender BHK-Zellüberstand wird (konzentriert oder verdünnt in Tris/BSA, pH 7.4) pro Schnitt aufgetragen und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei R.T. inkubiert.
- Die Objekträger werden 5 Minuten in Tris/NaCl-Waschpuffer, pH 7.4, mit 0,1 % BSA gewaschen.
- 15 - Pro Schnitt werden 50 μl Hybridomüberstand des murinen anti β -Glucuronidase MAK BW 2118/157 hinzugegeben und die Objekträger für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei R.T. inkubiert.
- Anschließend werden die Objekträger 5 Minuten in Tris/NaCl- Waschpuffer, pH 7.4, mit 0,1 % BSA gewaschen.
- Es werden 20-100 μl Brücken-AK (Kaninchen-anti Maus IgG 1:100 verd. in Human-Serum, pH 7.4) pro Schnitt aufgetragen und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei R.T. inkubiert.
- 20 - Anschließend werden die Objekträger 5 Minuten in Tris/NaCl-Waschpuffer, pH 7.4, mit 0,1 % BSA gewaschen.
- Danach werden 20-100 μl APAAP-Komplex (Maus-anti AP 1:100 verd. in Tris/BSA, pH 7.4) pro Schnitt aufgetragen und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei R.T. inkubiert.
- Anschließend werden die Objekträger 5 Minuten in Tris/NaCl- Waschpuffer, pH 7.4, mit 0,1 % BSA gewaschen.
- 25 - Das Substrat für die alkalische Phosphatase wird wie folgt angesetzt (100 ml Substratlösung, ausreichend für eine Glasküvette):

30 Lösung 1: 3,7 g NaCl
2,7 g Tris/Base in 75 ml Aqua dest
lösen

35 + 26,8 ml Propandiol-Puffer, pH 9.75,
einstellen mit HCl

+ 42,9 mg Levamisol => klare, farblose Lösung

40 Lösung 2: 21,4 mg Natriumnitrit in 535 μl Aqua dest
lösen

=> klare, farblose Lösung

45 Lösung 3: 53,5 mg Naphthol-AS-Biphosphat in 642 μl
Dimethylformamid (DMF) lösen =>
klare, gelbliche Lösung

- In Lösung 2 (Natriumnitrit) 368 μl 5%ige Neufuchsin-Lsg. geben und 1 Minute (Stoppuhr) reagieren lassen, so daß sich eine klare, braune Lösung ergibt
- Lösung 2 (Natriumnitrit mit Neufuchsin) und Lösung 3 (Naphthol-AS-Biphosphat) in Lösung 1 (Tris/NaCl/Propandiol-Puffer) geben => klare, gelbliche Lösung
- pH 8.8 einstellen mit HCl => trübe, gelbliche Lösung
- Lösung filtrieren und auf die Objekträger geben und 15 Minuten auf einem Schüttler reagieren lassen => Lösung wird trüb.
- 55 - Objekträger 10 Minuten in Tris/NaCl-Puffer, pH 7.4, waschen
- Objekträger 10 Minuten in Aqua dest waschen
- Nach 2 Stunden Lufttrocknen werden die Objekträger in Kaiser's Glyzerinjelatine bei 56° C eingedeckelt.

Die spezifische Bindung des Fusionsproteins wurde lichtmikroskopisch durch die Rotfärbung der Epitoppositiven Gewebeschnitte nachgewiesen. Vergleichende Untersuchungen mit dem murinen MAK BW 431/26, der mittels der indirekten APAAP-Technik nachgewiesen wurde (Cordell et al., J. Histochem. Cytochem. 32, 219, 1984), ergaben, daß die Gewebespezifität des Fusionsproteins mit der des murinen MAK BW 431/26 genau übereinstimmte, d.h., daß sowohl der Reaktionstyp im individuellen Präparat, wie auch die Anzahl der positiven und negativen Befunde aus einer Vielzahl verschiedener Karzinome und Normalgewebe identisch ist.

5

Beispiel M:

10

Reinigung des 431/26hum V_Hhu_BGlc 1H Fusionsproteins

Murine bzw. humanisierte MAK können mittels immunaffinitätschromatographischer Verfahren, die für den Fc-Teil dieser Moleküle selektiv sind, gereinigt werden. Da in dem 431/26hum V_Hhu_BGlc 1H Fusionsprotein kein Fc-Teil vorhanden ist, mußte eine alternative hochselektive immunaffinitätschromatographische Methode entwickelt werden. Neben der Selektivität dieser zu entwickelnden Methode müssen die Isolationsbedingungen sehr milde sein, um die im sauren wie auch alkalischen Bereich sehr labile β -Glucuronidase nicht zu schädigen.

Das Prinzip der Methode besteht in der Reinigung des Fusionsproteins aus Überständen transfizierter 15 BHK-Zellen, mittels eines gegen die humanisierte V-Region gerichteten anti-idiotypischen MAK. Die Herstellung solcher MAK ist literaturbekannt (Walter et al., Behring Inst. Mitt., 82, 182-192, 1988). Dieser anti-idiotypische MAK kann sowohl murin wie auch humanisiert sein. Der MAK ist vorzugsweise auf einer festen Phase so immobilisiert, daß seine V-Region nicht geschädigt wurde. Beispiele hierzu sind literaturbekannt (Fleminger et al., Applied Biochem. Biotechnol., 23, 123-137, 1990; Horsfall et al., JIM 104, 43-49, 1987).

20 Der so auf der festen Phase nach bekannten Methoden immobilisierte anti-idiotypische MAK bindet das aus transfizierten BHK-Zellen zu reinigende Fusionsprotein sehr effizient, z.B. bei pH 7, hat aber die überraschende Eigenschaft, daß er das Fusionsprotein schon bei einer Absenkung des pH-Wertes um 2,5 Stufen, auf pH 5,5, nicht mehr bindet. Das Fusionsprotein wird durch diese milde pH-Elutionstechnik weder 25 in seiner Fähigkeit, an CEA zu binden, noch in seiner enzymatischen Aktivität beeinträchtigt (Methodik siehe Beispiel J).

30 In Tab. 5 sind die OD Werte und fluorogenen Einheiten (FU) der einzelnen Fraktionen aus einer Reinigung mit Hilfe des Festphasen-immobilisierten, anti-idiotypischen MAK BW 2064/34 gezeigt.

35

40

45

50

55

Tabelle 5

Anti-idiotype Affinitätschromatographie				
5	Fraktionen	OD in % FU in % pH-wert Chromatografieverlauf		
10	1-5	1	0	7.2
	6-142	20	0	7.2
	143-162	1	0	7.2
				Vorspülen der Säule mit PBS, pH 7.2
				Probenauftrag
				Spülen der Säule mit PBS, pH 7.2
15	163	1	0	7.2
	164	1	0	7.2
	165	1	0	7.2
	166	1	0	6.8
	167	2	10	6.1
20	168	5	20	5.7
	169	16	40	5.6
	170	23	80	5.5
	171	26	100	5.4
	172	24	80	5.3
25	173	19	60	5.2
	174	14	40	5.2
	175	10	30	5.1
	176	8	25	5.1
	177	6	20	5.1
	178	3	10	5.0
	179	2	5	5.0
	180	1	0	5.0
30	1 Fraktion = 6.6 min sammeln (bei 18 ml/h Pumpengeschwindigkeit)			
	= 2 ml			
	Die FU-Werte sind in % des höchsten Wertes (Fraktion 171) angegeben.			

Mittels der OD Messung bei 280 nm wurde die Elution des Fusionsproteins als Protein gemessen. Zusätzlich wurden die isolierten Fraktionen auf spezifische Bindung an CEA und gleichzeitige Enzymaktivität im Spezifitätsenzymaktivitätstest überprüft (Beispiel J). Die Werte zeigen, daß die gesamte spezifische Bindungs- und Enzymaktivität in einem Peak (um pH 5.0 bis pH 5.6 Elutionspeak) konzentriert war. Hieraus ist zu folgern, daß die so beschriebene Methode der Antiidiotyp-Affinitätschromatographie eine sehr effiziente und selektive Reinigungstechnik für das 431/26hum V_Hhu β Glc 1H Fusionsprotein darstellt.

40 Beispiel N:

Gelchromatographie der Fusionsproteine

45 Die Überstände von den das 431/26hum V_H hu β Glc 1H Fusionsprotein sekretierenden BHK Zellen (B 70/6, B 74/2, B 72/72, B 73/2) wurden abgenommen, sterilfiltriert und einer analytischen Gelfiltration unterworfen. Dazu wurde eine TSK G3000 SW-XL Säule (7.8 x 300 mm) mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 6.7, + 0.02 % NaN₃ equilibriert, 20 μ l des Überstandes aufgetragen und mit einer Flußrate von 0.6 ml/min eluiert. Beginnend mit einer Elutionszeit von 9 min (Ausschlußvolumen 9.5 min) wurden Fraktionen (je 0.3 min) gesammelt und auf β -Glucuronidaseaktivität getestet.

50 Dazu wurden 25 μ l aus der jeweiligen Fraktion mit 75 μ l Substratlösung (2.5 mM 4-Methylumbelliferyl- β -glucuronid in 200 mM Na-Acetatpuffer, pH 5, + 0.1 mg/ml BSA) gemischt und bei 37° C 2 Stunden inkubiert. Dann wurde mit 1.5 ml 0.2 M Glycin/0.2 % SDS-Lösung, pH 11.7, abgestoppt und der von der Glucuronidase freigesetzte fluoreszierende Label mit einem Hitachi Fluorometer (bei 360 nM Anregungswellenlänge, 450 nM Emissionswellenlänge) quantifiziert.

55

Ergebnis:

Alle 4 Konstrukte zeigen einen einzigen Hauptaktivitätspeak zwischen Fraktionen 4 und 6 (Tabelle 6).

Das entspricht Retentionszeiten von ca. 10.2 - 10.8 min. Die in den Überständen vorliegenden Glucuronida-
seaktiven Fusionsproteine haben somit Retentionszeiten, die in der gleichen Gößenordnung wie die von
chemisch hergestellten Antikörper- β -Glucuronidasekonstrukten (10.4 min) liegen. Die Retentionszeit für das
freie Enzym liegen bei 11.9, für den freien Antikörper bei 12.3 min.

5

Tabelle 6:
Gelfiltration unterschiedlicher Fusionsproteine

10

Inkubation: 25 μ l, 37° C, 120 min
Substanzkonzentration: 1.875 mM; 0.1 mg/ml BSA
Fraktion je 0.3 min; Start bei 9 min

15

freigesetzter Label/Assay (FU)
Fraktionen B70/6 B74/2 B72/72 B73/2

20

	1	11	17	15	15
	2	22	35	44	38
	3	125	97	873	1014
25	4	1072	196	2959	3994
	5	1588	165	2206	3141
	6	1532	120	1133	1760
	7	941	103	581	926
30	8	710	69	376	723
	9	500	108	302	626
	10	371	123	316	613
	11	320	107	263	472
35	12	254	91	210	456
	13	224	57	146	357
	14	190	65	134	332
40	15	171	52	83	294
	16	167	44	99	243
	17	100	38	73	217
	18	129	34	55	179
45	19	75	45	48	155
	20	66	41	36	129
	21				118
	22				93
50	23				78
	24				61
	25				24
	26				51

55

Beispiel O:

Molekulare Charakterisierung des 431/26 hum V_H hu β Glc1H Fusionsproteins

In Beispiel M wurden die Fusionsproteine mittels Antiidiotyp-Affinitätschromatographie gereinigt. Aliquots aus dem Elutionspeak von pH 5.5 wurden in der 10 % SDS-PAGE unter nicht reduzierenden bzw. 5 reduzierenden Bedingungen elektrophoriert und im Westernblot mit Hilfe antiidiotypischer MAK bzw. mit anti β -Glucuronidase MAK immunfärbt (Towbin and Gordon (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354).

Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte beim 431/26 hum V_H hu β Glc1H Fusionsprotein eine Hauptbande von \approx 125 kDa und eine Bande von 250 kDa nachgewiesen werden, die sowohl von anti-idiotypischen MAK als auch von anti β -Glucuronidase MAK im Western Blot nachweisbar waren. Unter 10 reduzierenden Bedingungen war weder durch die anti-idiotypischen noch durch die anti β -Glucuronidase MAK 15 eine Immunfärbung erkennbar. In der reduzierenden SDS-PAGE konnte eine 100 kDa und eine 25 kDa Bande nachgewiesen werden. Diese unter denaturierenden Bedingungen analysierten Moleküle liegen allerdings unter nativen Bedingungen nach TSK G 3000 SW-XL Gelfiltration als ein höher molekulares 20 Produkt vor, welches ein Molekulargewicht von \approx 250 kDa hat (Beispiel N). In Fig. M sind schematische Darstellungen des 431/26 hum V_H hu β Glc1H Fusionsproteins gezeigt. Die Figur Mb zeigt das Monomer, welches eine \approx 25 kDa leichte Kette und eine \approx 100 kDa schwere Kette besitzt. Dieses Monomer und ein über "inter heavy chain" Disulfidbrücken verknüpftes Dimer lässt sich unter denaturierenden Bedingungen nachweisen (Fig. Ma). Unter nativen Bedingungen liegt das Fusionsprotein als Dimer von \approx 250 kDa vor, mit 25 bzw. ohne "inter heavy chain" Disulfidbrücken (Fig. Mc).

BEISPIEL P:**Chemische Modifizierung des Fusionsproteins**

25 Das nach Beispiel N gereinigte Fusionsprotein (110 μ g/ml) wurde auf pH 4.5 eingestellt und mit Natriumperiodat versetzt (Endkonzentration 1 mM). Nach 1stündiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen wurde das Natriumperiodat mittels Gelchromatographie entfernt und das Fusionsprotein dann auf pH 8 umgestellt. Nach Zugabe von Ethanolamin bis zu einer Endkonzentration von 0.1 M wurde weitere 30 3 Stunden bei 4° C inkubiert, dann Natriumcyanoborhydrid (Endkonzentration 5 mM) dazugegeben und 30 min inkubiert (Reduktion). Daran schloß sich wieder eine Gelfiltration zur Entfernung des Reduktionsmittels 35 und zur Umpufferung des Fusionsproteins an. Die chemische Modifikation hatte keine Auswirkung auf die funktionelle Aktivität des Fusionsproteins. Tab. 7 zeigt einen Verlauf der Plasmakonzentrationen von unmodifiziertem und modifiziertem Fusionsprotein in der Nacktmaus. Die Eliminierung des Fusionsproteins aus dem Plasma ist durch die Modifizierung stark verlangsamt.

Tabelle 7

40 Plasmaspiegel der β -Glucuronidaseaktivität in der Nacktmaus			
45 t [min]	β -Glucuronidase-Fusionsprotein		
	behandelt % Aktivität	unbehandelt % Aktivität	
0	100	100	
10		54	
30	76		
60		22	
240	40	4	
480		1	
50 1380	19		
1440		1	
5880	3		

55 **BEISPIEL Q:****Enzymatische Behandlung des Fusionsproteins**

53 µg Fusionsprotein (Beispiel N) in 0.01 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl wurden mit 1 Unit löslicher alkalischer Phosphatase (E. coli) bzw. immobilisierter alkalischer Phosphatase (bovine intestine) 20 h bei Raumtemperatur inkubiert. Tab. 8 zeigt den Verlauf der Plasmakonzentration von unbehandeltem und behandeltem Fusionsprotein in der Nacktmaus. Die Eliminierung wird durch die Enzymbehandlung nicht signifikant beeinflußt.

Tabelle 8

Plasmaspiegel der β -Glucuronidaseaktivität in der Nacktmaus				
t [min]	β -Glucuronidase Fusionsprotein			AP (E. coli) behandelt [%]
	unbehandelt [%]	AP (Rinderdarm,immobil.) behandelt [%]	AP (E. coli) behandelt [%]	
0	100	100	100	100
10	78	76	65	
30	44	57	53	
60	35	36	35	
240	22	27	22	
1440	4	5	5	

20 AP = alkalische Phosphatase

Beispiel R:

25

Pharmakokinetik und Tumorretention des 431/26 hum V_H hu β Glc 1H Fusionsproteins

Beispielhaft wurden 5x 4 µg gereinigtes und mit 100 µg HSA/ml vermischt Fusionsprotein in unmodifizierter (Beispiel N) bzw. chemisch modifizierter Form (Beispiel P) i.v. in 24ständigen Abständen in 30 CEA exprimierende humane Tumor-tragende Nacktmäuse injiziert. Nach definierten Zeiträumen wurden je 3 Tiere durch Genickbruch getötet. Die Organe wurden entnommen, gewogen und mit 2 ml 1%igem BSA in PBS, pH 7.2, versetzt. Anschliessend wurden die Gewebe und Zellen aus diesen Organen durch pottern zerstört (10 Stöße) und die Menge an funktionell aktivem Fusionsprotein nach Zentrifugation der Suspension bei 3000 rpm und RT für 10' (Heraeus Labofuge GL, Typ 2202) im Spezifitätsenzym-Aktivitätstest 35 (siehe Beispiel J) in Überstand bestimmt. Die Daten aus einem repräsentativen Experiment sind in Tab. 9 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß sich das chemisch modifizierte Fusionsprotein, welches eine t_{1/2} β von \approx 4 h hat, spezifisch ab \geq 3 Tagen nach Beendigung der repetitiven Injektionsphase im Tumor anreichert. Das unmodifizierte Fusionsprotein, welches eine t_{1/2} β von \approx 20 min besitzt, zeigte unter den gleichen experimentellen Bedingungen keine signifikante Tumoranreicherung.

40 Aus diesen Daten darf gefolgert werden, daß das hu 431 β -Glc Fusionsprotein in der Lage ist, in vivo an CEA-positive Tumore zu binden und dort als enzymatisch aktives Molekül über lange Zeiträume ($>$ 9 Tage) zu verweilen. Der Zeitpunkt für die Anwendung der Prodrug sollte in diesem System zwischen Tag 3 und 9 nach Beendigung der Fusionsproteininjektion liegen.

45

50

55

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Tabelle 9:

Tumorretentionsexperiment mit CEA-positivem humanem Magenkarzinom Xenograft (Mz Sto 1)

i.v. Injektion von $5 \times 4 \mu\text{g}$ Fusionsprotein pro Maus in 24-Stundenintervallen

Zeit (Std.) nach letzter i.v. Injektion	Tumor	% Aktivität/g Tumor oder Organ				
		Leber	Lunge	Milz	Niere	Eingeweide
3		100	100	100	100	100
24	86.7	49.3	26.3	—	64	123
72	26.4	11	4.4	—	8.1	19
216	24.4	1.5	0.13	1.2	0.4	0.5
						0.015
						44.4
						6.5

55 Beispiel S:

Isoelektrische Fokussierung des 431/26 hum V_H hu β Glc 1H Fusionsproteins

Das mittels Anti-idiotyp Affinitätschromatographie gereinigte Fusionsprotein (Beispiel N) wurde im "Pharmacia Fast System" isoelektrisch entsprechend der Methode von Righetti et al. (1979) fokussiert. Hierbei zeigte sich, daß der isoelektrische Punkt des Moleküls in einem pH-Bereich von 7.35 bis 8.15 liegt.

5 **BEISPIEL T:**

Nachweis der Spaltbarkeit einer Zytostatika-Prodrug durch 431/26 hum V_H hu β Glc 1H Fusionsprotein

10 Im Beispiel J wurde gezeigt, daß der β -Glucuronidaseanteil des Fusionsproteins, ähnlich wie das menschliche native Enzym, in der Lage ist, das β -Glucuronid des 4-Methylumbelliferol zu spalten. In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde als Substrat für die enzymatische Spaltung ein über eine Spacergruppe verknüpftes β -Glucuronid des Zytostatikums Daunomycin eingesetzt. Im einzelnen wurden diese Untersuchungen wie folgt durchgeführt:

15 4 mg der in der französischen Patentanmeldung (No. d'Enregistrement National: 9105326) beschriebenen Verbindung N-(4-hydroxy-3-nitro-benzyloxycarbonyl)-daunorubicin- β -D-glucuronid (Prodrug) wurden in 1 ml 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.2, gelöst. Zu jeweils 5 μ l dieser Substratlösung wurden 35 μ l des Fusionsproteins (Beispiel N) bzw. der humanen β -Glucuronidase (Gesamtkonzentration jeweils 6.5 U/ml; 1 U = Spaltung von 1 μ Mol 4-Methylumbelliferol/min bei 37° C) hinzugefügt und bei 37° C im Dunkeln 20 inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben (5 μ l) des Inkubationsansatzes entnommen und direkt mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie unter folgenden Bedingungen analysiert:

25 Säule:
Nucleosil 100 RP 18, 5 μ m Teilchendurchmesser, 125 x 4.6 mm
Mobile Phase:
Gradient aus Lösung A (100 % Acetonitril) und Lösung B (20 mM Phosphat-Puffer pH 3.0)
0 min: 30 % Lösung A
15 min: 70 % Lösung A
20 min: 70 % Lösung A
Flußrate: 1 ml/min

30 Detektion: Fluoreszenz, Excitation 495 nm, Emission 560 nm
Datenauswertung: Beckman System Gold Software
Die Retentionszeit der Ausgangsverbindung (Prodrug) betrug unter diesen Chromatographiebedingungen 11 min. Die während der Inkubation entstehende Verbindung (Drug) wies eine mit Daunomycin (DNM, Analyse eines Standards unter gleichen Bedingungen) identische Retentionszeit von 8.9 min auf. Die Kinetik der 35 Spaltung der Ausgangsverbindung durch das Fusionsprotein bzw. humane β -Glucuronidase sind in Tab. 11 bzw. Tab. 10 dargestellt.

Die Halbwertszeit der Spaltung der Prodrug durch das Fusionsprotein betrug 2.3 h. Die Spaltung durch humane β -Glucuronidase erfolgte mit einer Halbwertszeit von 0.8 h. Wie bereits im Beispiel J dargestellt zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen, daß der β -Glucuronidaseanteil des Fusionsproteins funktionell 40 aktiv und in der Lage ist, β -Glucuronide zu spalten. Die Kinetik der Abspaltung des Glucuronidanteiles bzw. die Freisetzung der Drug (Daunomycin) aus der verwendeten Prodrug erfolgt mit einer zu humaner β -Glucuronidase größtenteils vergleichbaren Geschwindigkeit, so daß die Substratspezifität des Fusionsproteins im wesentlichen mit der von humaner β -Glucuronidase übereinstimmt.

45

Tabelle 10

Kinetik der Prodrugspaltung durch β -Glucuronidase (human, rekombinant)		
t min	prodrug area %	DNM area %
0	99.2	0.8
57	36.0	64.0
130	10.3	89.7
227	9.3	90.7

55

Tabelle 11

Kinetik der Prodrugspaltung durch β -Glucuronidase (Fusionsprotein)		
t min	prodrug area %	DNM area %
0	98.9	1.1
50	81.1	18.9
135	51.7	48.3
190	33.0	67.0
247	22.0	78.0
317	12.4	87.6

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Sequenzprotokoll

5 Seq. ID No.: 1
 Art der Sequenz: Nukleotid mit entsprechendem Protein
 Sequenzlänge: 354
 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 10 Art des Moleküls: cDNA
 Organismus: Mensch
 Name der Zelllinie: Hybridom 431/26
 Eigenschaften: V_H Immunglobulinen

15

20

Tab. 3

431/26 VH hum

25

10	30	50
caactgcaggagagcggtccaggcttgtgagaccta	ccagaccctgagcctgacactgc	
GlnLeuGlnGluSerGlyProGlyLeuValArgProSerGlnThrLeuSerLeuThrCys		
70	90	110
accgtgtctggcttcaccatcagcagtggttata	gactctggcactgggtgagacagccacct	
ThrValSerGlyPheThrIleSerSerGlyTyrSerTrpHisTrpValArgGlnProPro		
130	150	170
ggacgaggcttgagtgaggattgatacatacag	tacactacactacaacccc	
GlyArgGlyLeuGluTrpIleGlyTyrIleGlnTyrSerGlyIleThrAsnTyrAsnPro		
190	210	230
tctctcaaaagttagagtgacaatgtggtagacacc	caagaaccaggatccagcctgaga	
SerLeuLysSerArgValThrMetLeuValAspThrSerLysAsnGlnPheSerLeuArg		
250	270	290
ctcagcagcgtgacagccggcagacaccgcgg	tctattattgtgcaagagaagactatgat	
LeuSerSerValThrAlaAlaAspThrAlaValTyrTyrCysAlaArgGluAspTyrAsp		
310	330	350
taccactggtaacttcgatgtctgggtcaaggc	agcgtcacagtctcctca	
TyrHisTrpTyrPheAspValTrpGlyGlnGly	SerLeuValThrValSerSer	

45

50

55

Seq. ID. No.: 2

Art der Sequenz: Nukleotid mit entsprechendem Protein

Sequenzlänge: 330

Strangform: Einzelstrang

5 Topologie: linear

Art des Moleküls: cDNA

Organismus: Mensch

Name der Zelllinie: Hybridom 431/26

10 Eigenschaften: V_K Immunglobulinen

10

15

20

431/26 VK hum

25

10	30	50
ggtgtccactccgacatccagatgacccagagccaaagcagcctgagcgccagcgtgggt		
GlyValHisSerAspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSerValGly		
70	90	110
gacagagtgaccatcacctgttagtaccagctcgagtgtaaagttaacatgcactggtaaccag		
AspArgValThrIleThrCysSerThrSerSerValSerTyrMetHisTrpTyrGln		
130	150	170
cagaagccaggttaaggctccaaagctgtgtatctacagcacatccaaacctggcttctgg		
30 GlnLysProGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrSerThrSerAsnLeuAlaSerGly		
190	210	230
gtgccaaggcaggattcagcggtacgcggtagcggtagccgacttcaccttaccatcagcagc		
ValProSerArgPheSerGlySerGlyThrAspPheThrPheThrIleSerSer		
250	270	290
ctccagccagaggacatgccacactactgcccattcgtggagtagttatcccacgttc		
LeuGlnProGluAspIleAlaThrTyrTyrCysHisGlnTrpSerSerTyrProThrPhe		
310	330	
40 ggccaagggaccaagggtggaaatcaaacgt		
GlyGlnGlyThrLysValGluIleLysArg		

Patentansprüche

45

1. Fusionsproteine zur Prodrug-Aktivierung der Formel huTuMAK-L- β -Gluc, wobei huTuMAK einen humanisierten tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder ein tumorbindendes Fragment davon bedeutet, L für einen Linker steht und β -Gluc human β -Glucuronidase ist.
- 50 2. Fusionsproteine nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V_H-Exon, einem CH₁-Exon und einem Hinge-Exon besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, welche nicht durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.
- 55 3. Fusionsproteine nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V_H-Exon, einem CH₁-Exon und zwei Hinge-Exons besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, bei welchem die schweren Ketten Fragmente durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.
4. Fusionsproteine nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V_H-Exon, einem CH₁-

Exon und drei Hinge-Exons besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

5. Fusionsproteine nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V_H -Exon, einem CH_3 -Exon besteht und bei Expression zusammen mit einer modifizierten leichten Kette aus V_L und CH_3 Domäne assoziieren kann.
6. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der huTuMAK-Anteil aus MAK BW 431/36 stammt.
- 10 7. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der huTuMAK-Anteil aus einer der in EP-A1-0 388 914 beschriebenen MAK gebildet wird.
8. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 7, in dem L einen Polypeptidspacer nach Tab. 1 und/oder 2 enthält.
- 15 9. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 8, in dem L 1, 2 oder 3 Hinge-Regionen eines humanen IgG3 C-Gens enthält.
- 20 10. Plasmide, die die cDNA für Peptide nach Anspruch 1 bis Anspruch 9 enthalten.
11. Transformierte eukaryotische Zellen, die mit Plasmiden nach Anspruch 10 transformiert sind.
12. Verfahren zur Herstellung von Proteinen nach Anspruch 1 bis Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß in transformierten Zellen mittels Plasmiden diese Fusionsproteine exprimiert werden und die Isolierung besagter Fusionsproteine über antiidiotypische MAK erfolgt.
- 25 13. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine mit einem Oxidationsmittel behandelt werden.
- 30 14. Fusionsproteine nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß in einem zweiten Reaktionsschritt die Fusionsproteine reduktiv aminiert werden.
15. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 mit einem Oxidationsmittel behandelt werden.
- 35 16. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 in einem ersten Reaktionsschritt oxidiert werden und in einem zweiten Reaktionsschritt reduktiv aminiert werden.
- 40 17. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und Ansprüche 13 und 14 als Arzneimittel.
18. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und Ansprüche 13 und 14 als Diagnostikum.

45 **Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : GR, ES**

1. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen zur Prodrug-Aktivierung der Formel huTuMAK-L- β -Gluc, wobei huTuMAK einen humanisierten tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder ein tumorbindendes Fragment davon bedeutet, welcher über einen Linker L mit humaner β -Glucuronidase β -Gluc verbunden wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V_H -Exon, einem CH_1 -Exon und einem Hinge-Exon besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, welche nicht durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.
- 55 3. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V_H -Exon, einem CH_1 -Exon und zwei Hinge-Exons besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, bei welchem die schwere Ketten Fragmente durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

4. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V_H -Exon, einem CH_1 -Exon und drei Hinge-Exons besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V_H -Exon, einem CH_3 -Exon besteht und bei Expression zusammen mit einer modifizierten leichten Kette aus V_L und CH_3 Domäne assoziieren kann.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der huTuMAK-Anteil aus MAK BW 431/36 stammt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der huTuMAK-Anteil aus einer der in EP-A1-0 388 914 beschriebenen MAK gebildet wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, in dem L einen Polypeptidspacer nach Tab. 1 und/oder 2 enthält.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, in dem L 1, 2 oder 3 Hinge-Regionen eines humanen IgG3 C-Gens enthält.
10. Verfahren zur Herstellung von Plasmiden, die für Peptide nach Anspruch 1 bis Anspruch 9 kodieren, dadurch gekennzeichnet, daß die cDNA für Peptide nach Anspruch 1 - 9 in die Plasmide kloniert wird.
11. Verfahren zur Herstellung von transformierten eukaryotischen Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit Plasmiden nach Anspruch 10 transformiert werden.
12. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach Anspruch 1 bis Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß in transformierten Zellen mittels Plasmiden diese Fusionsproteine exprimiert werden und die Isolierung besagter Fusionsproteine über antiidiotypische MAK erfolgt.
13. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine mit einem Oxidationsmittel behandelt werden.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß in einem zweiten Reaktionsschritt die Fusionsprotein reduktiv aminiert werden.
15. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, dadurch gekennzeichnet, daß Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und Ansprüche 13 und 14 verwendet werden.
16. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums, dadurch gekennzeichnet, daß Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und Ansprüche 13 und 14 verwendet werden.

45

50

55

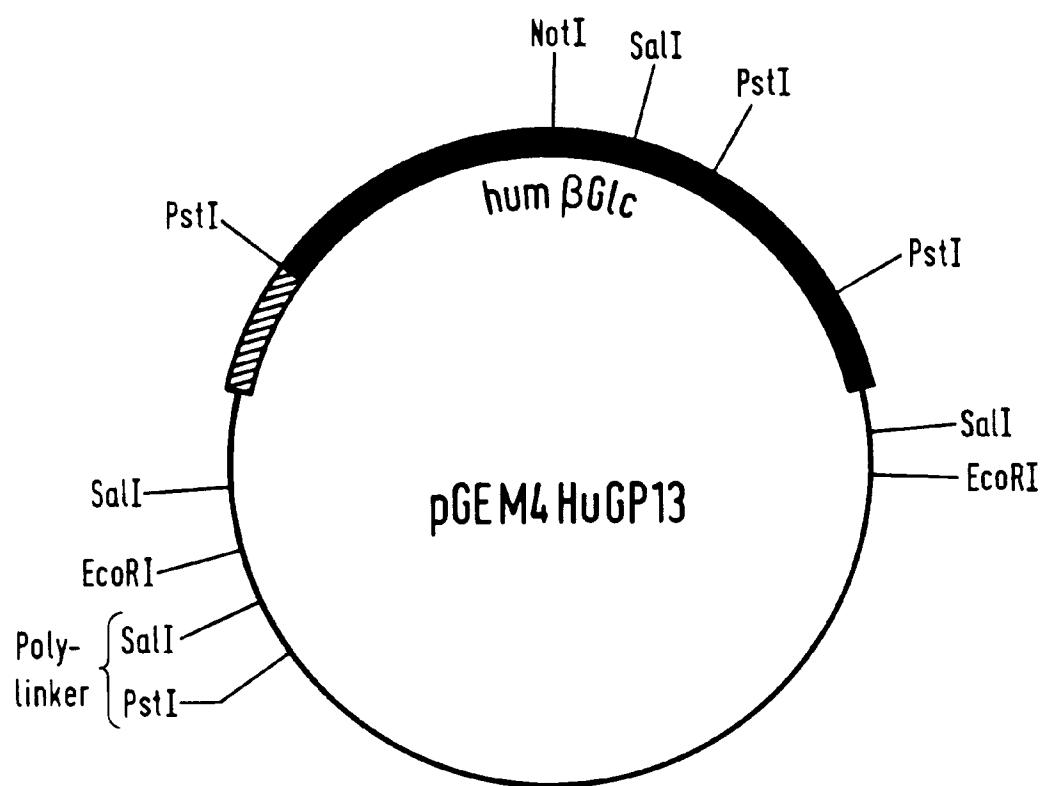


Fig. A

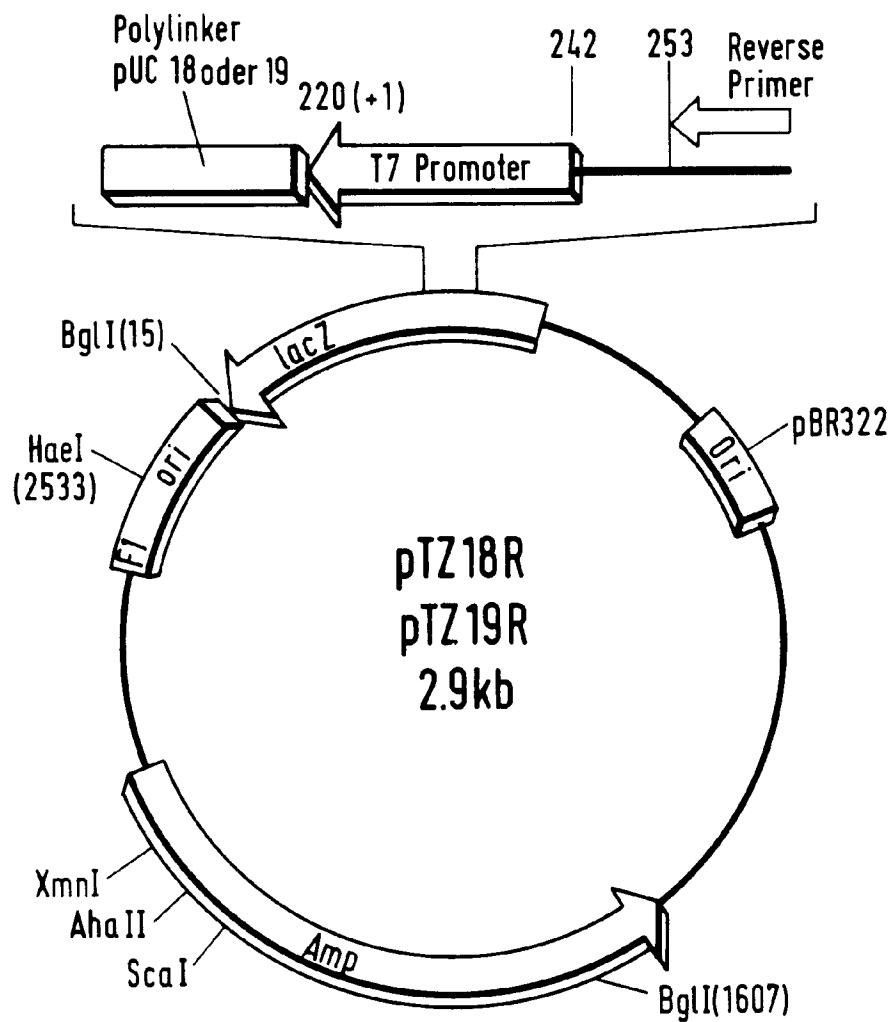


Fig. B.1

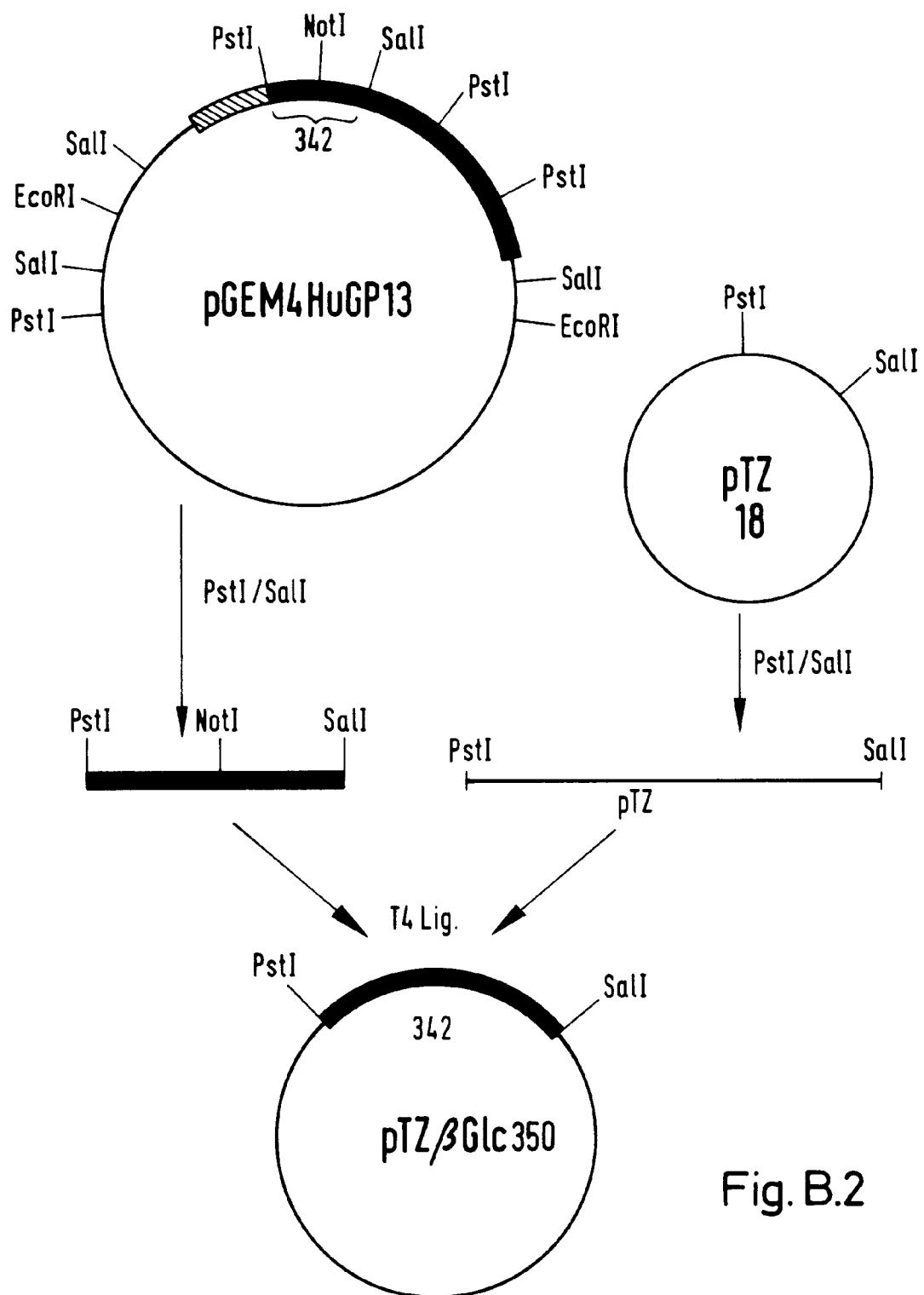
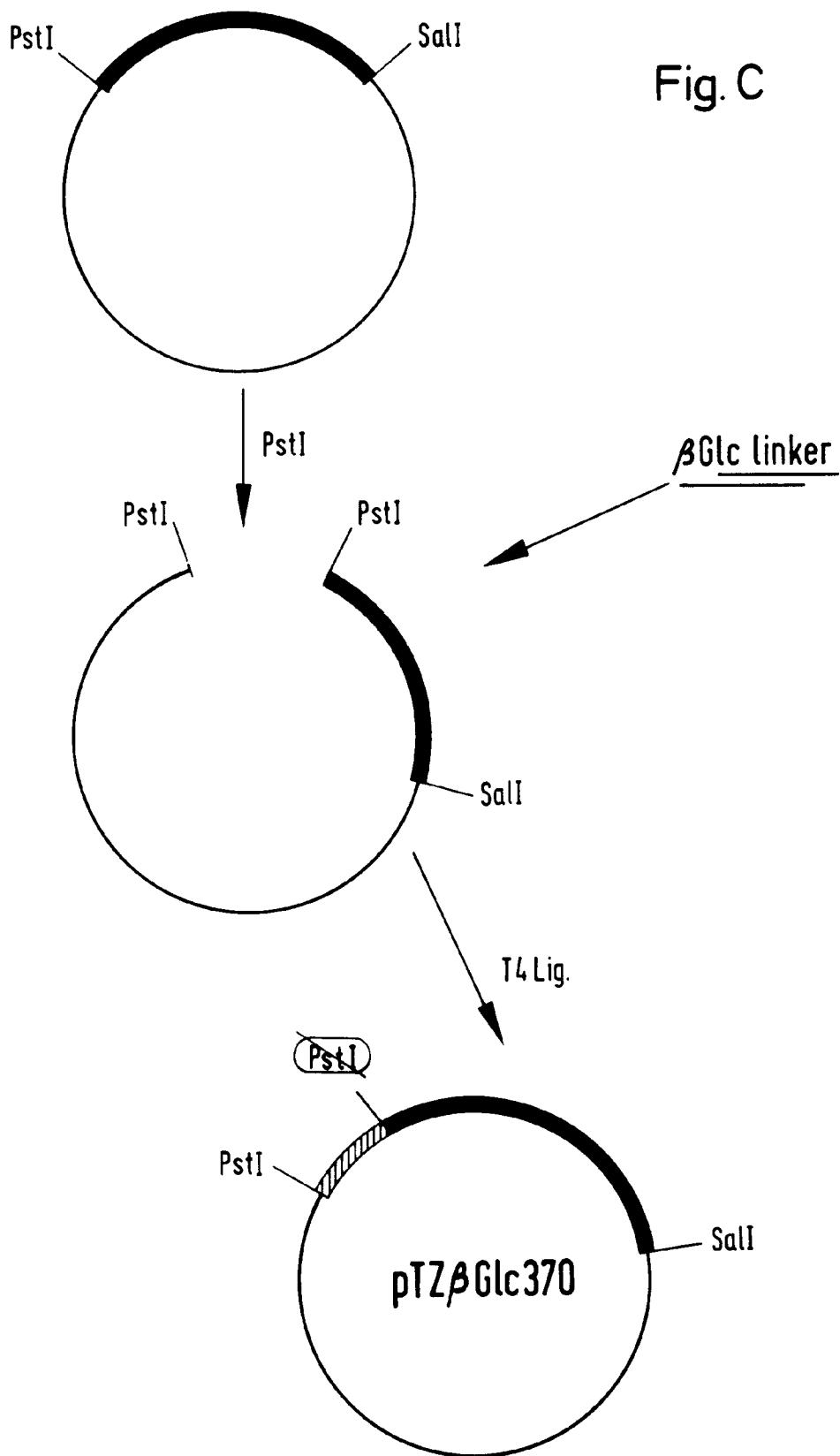


Fig. B.2



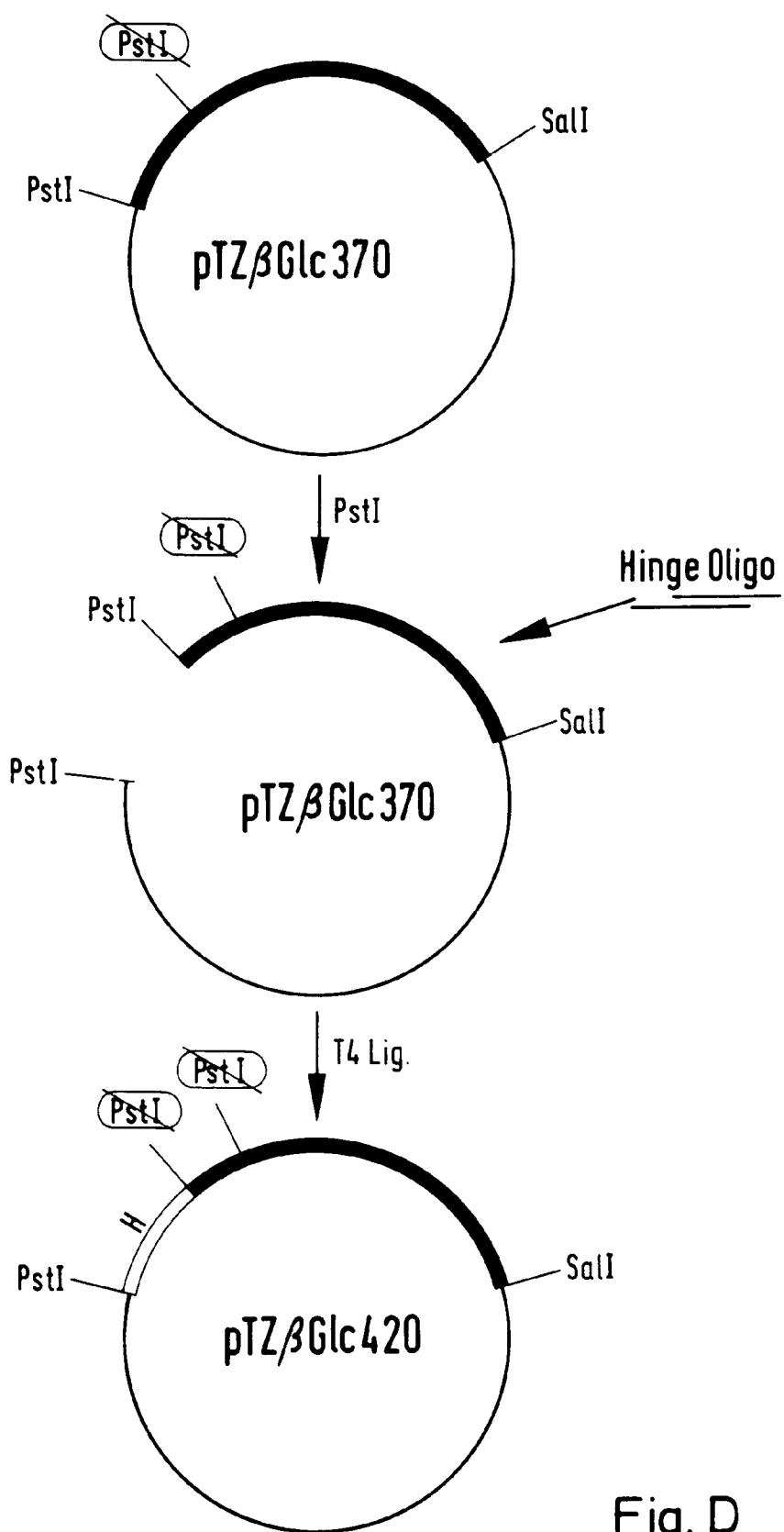


Fig. D

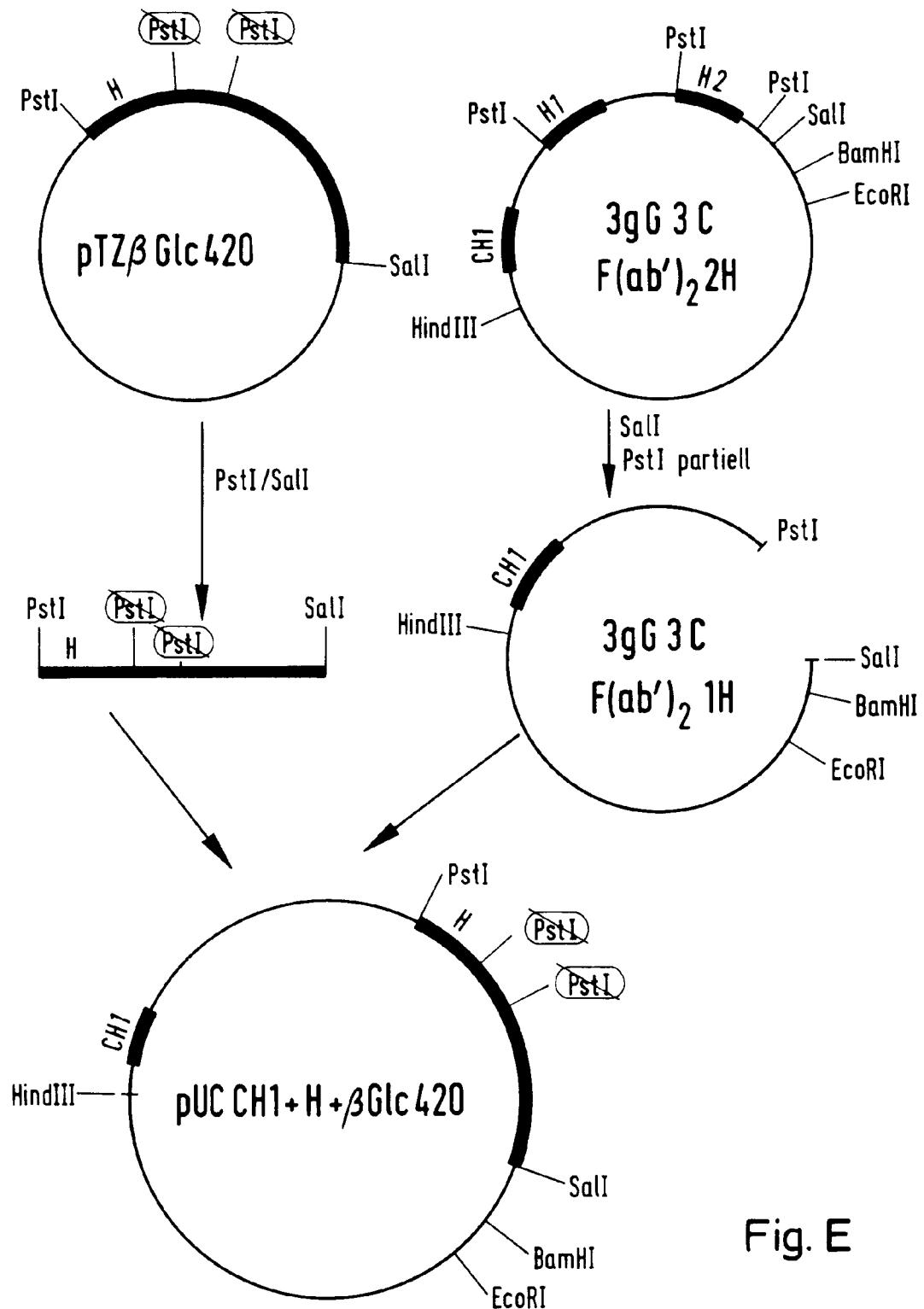


Fig. E

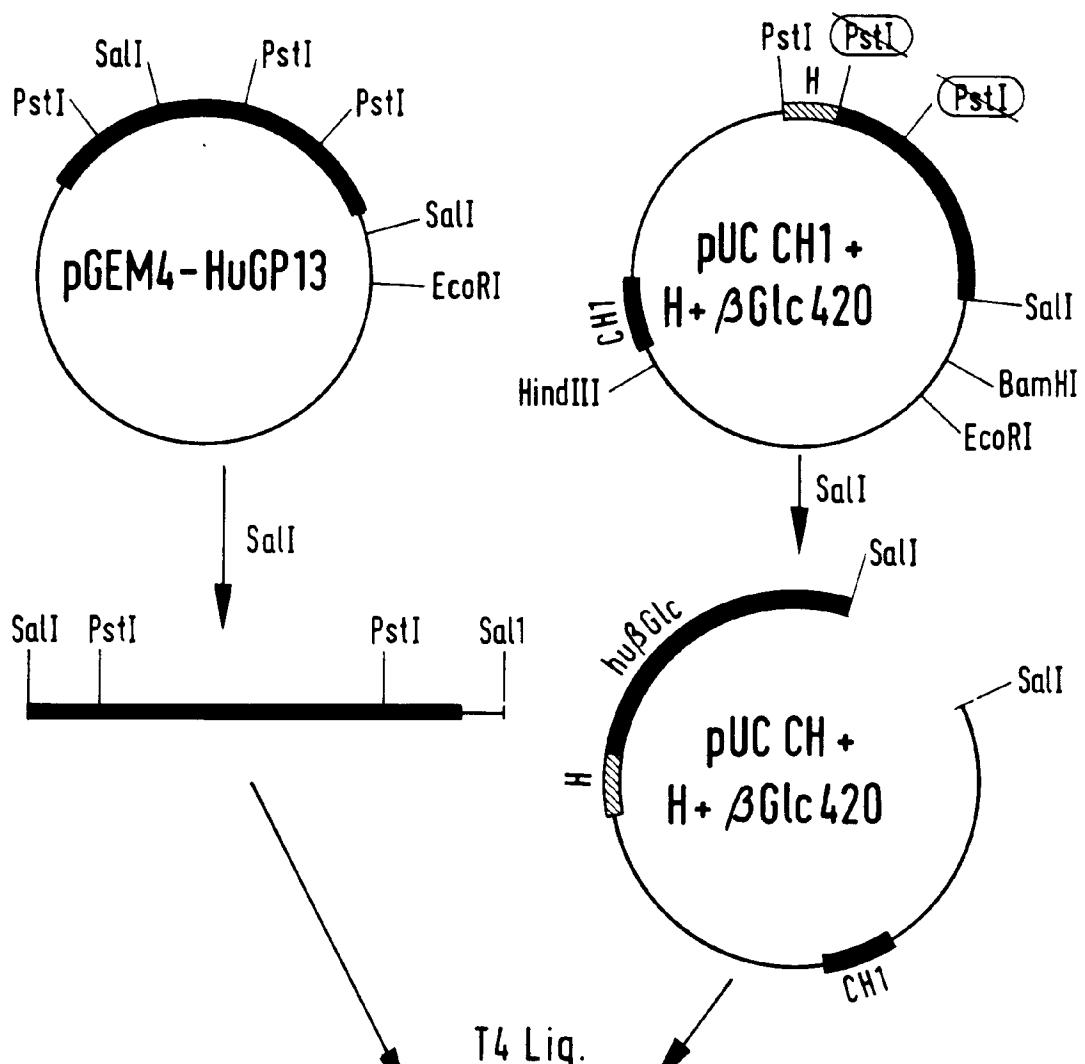
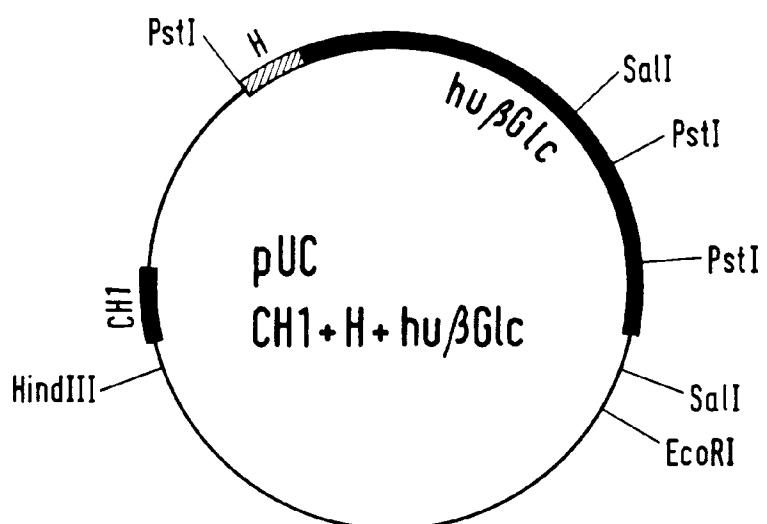


Fig. F



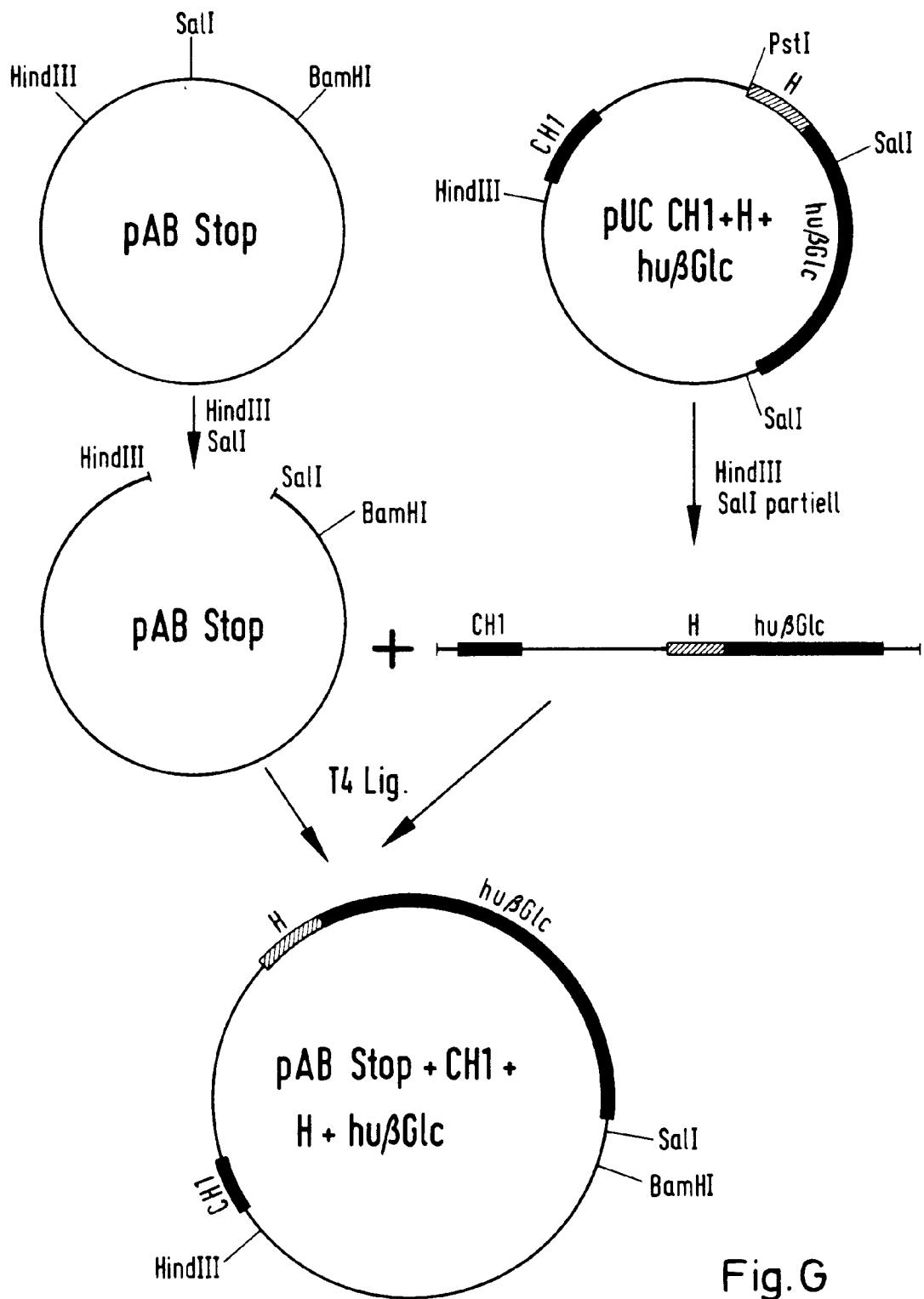


Fig. G

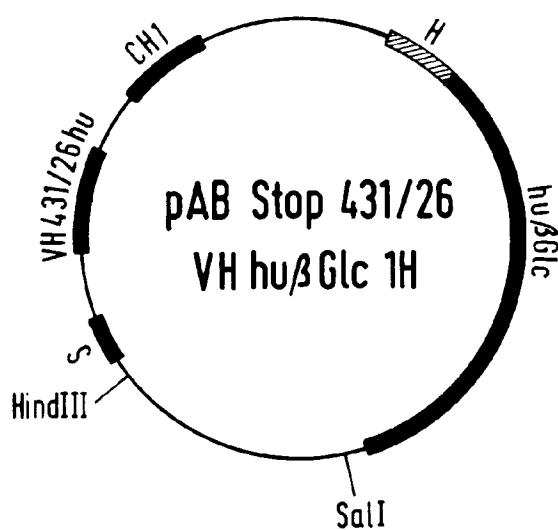
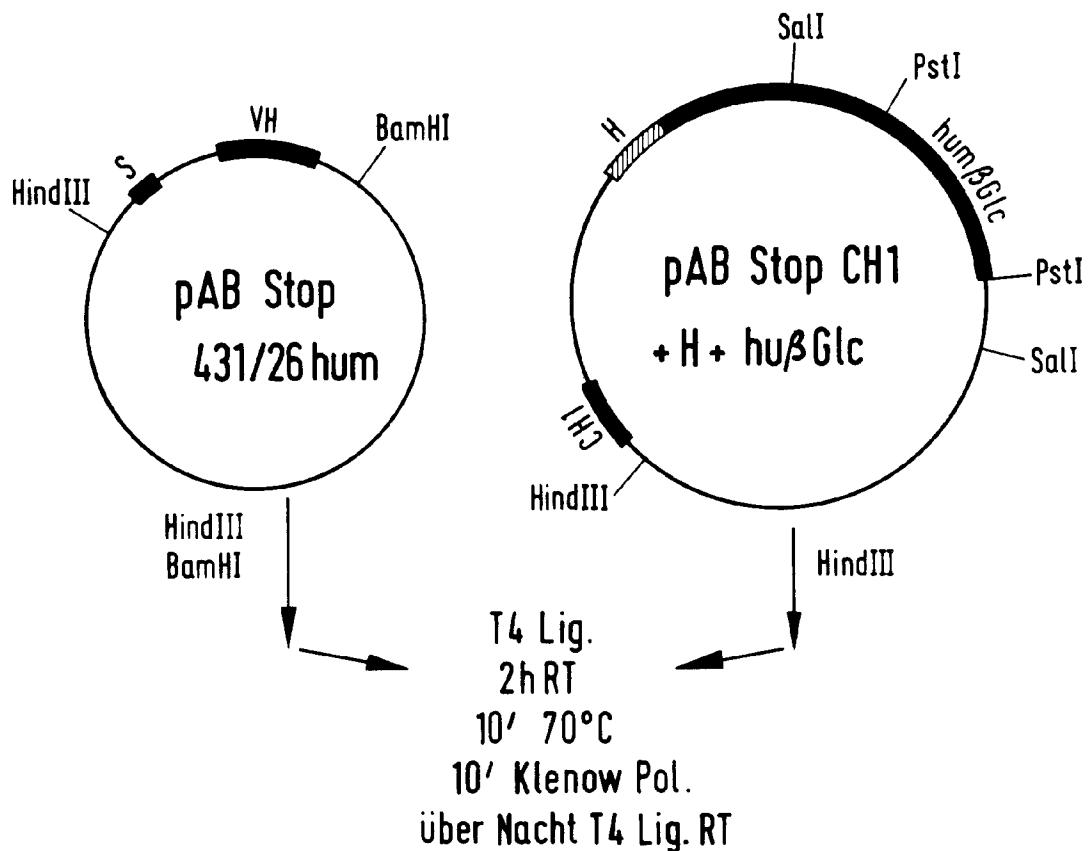


Fig. H

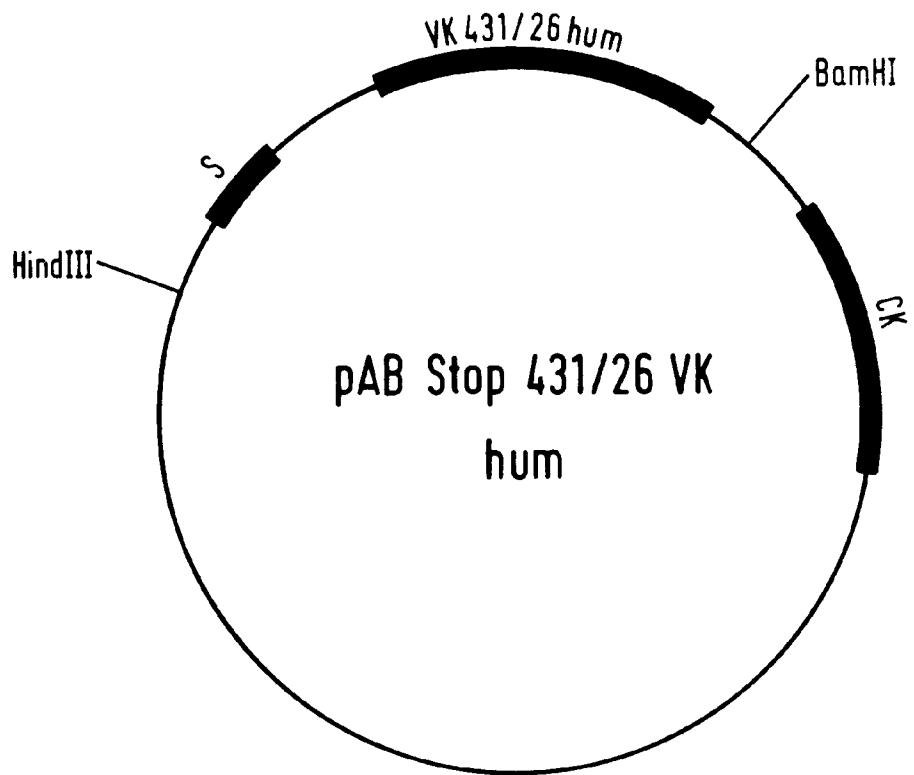


Fig. I

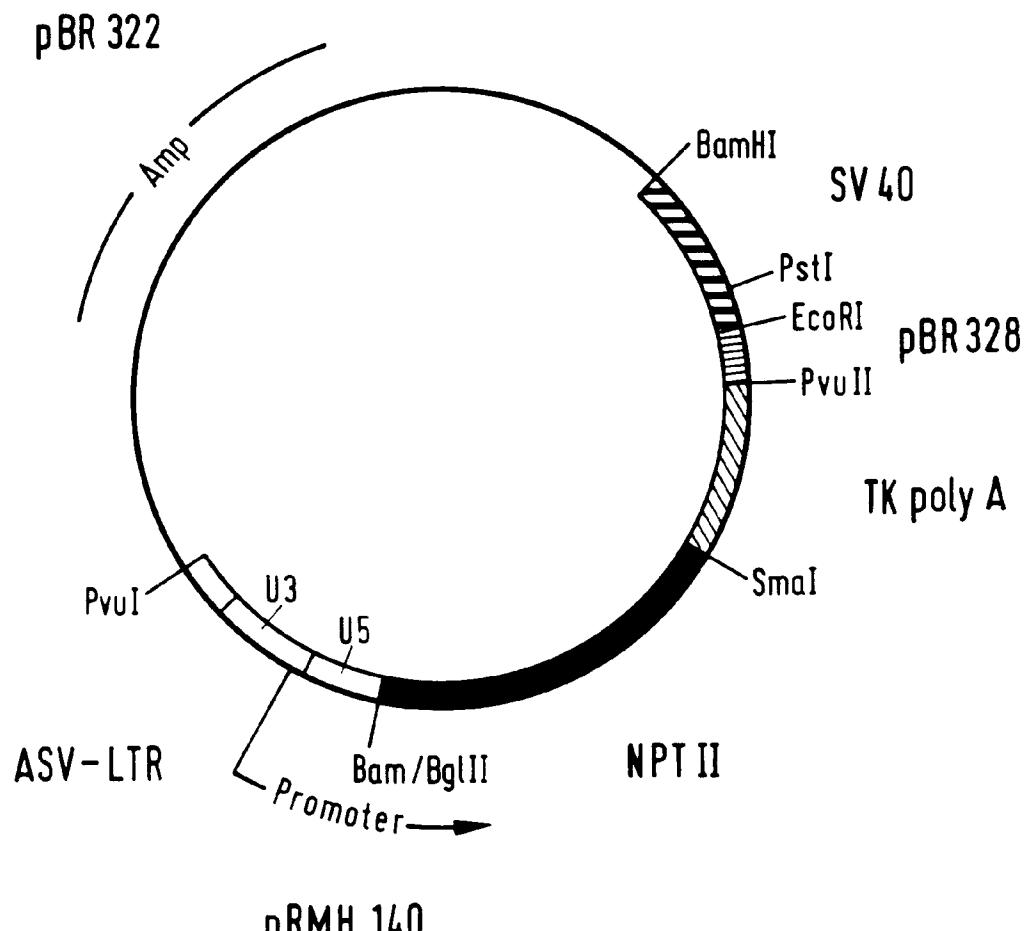


Fig. K

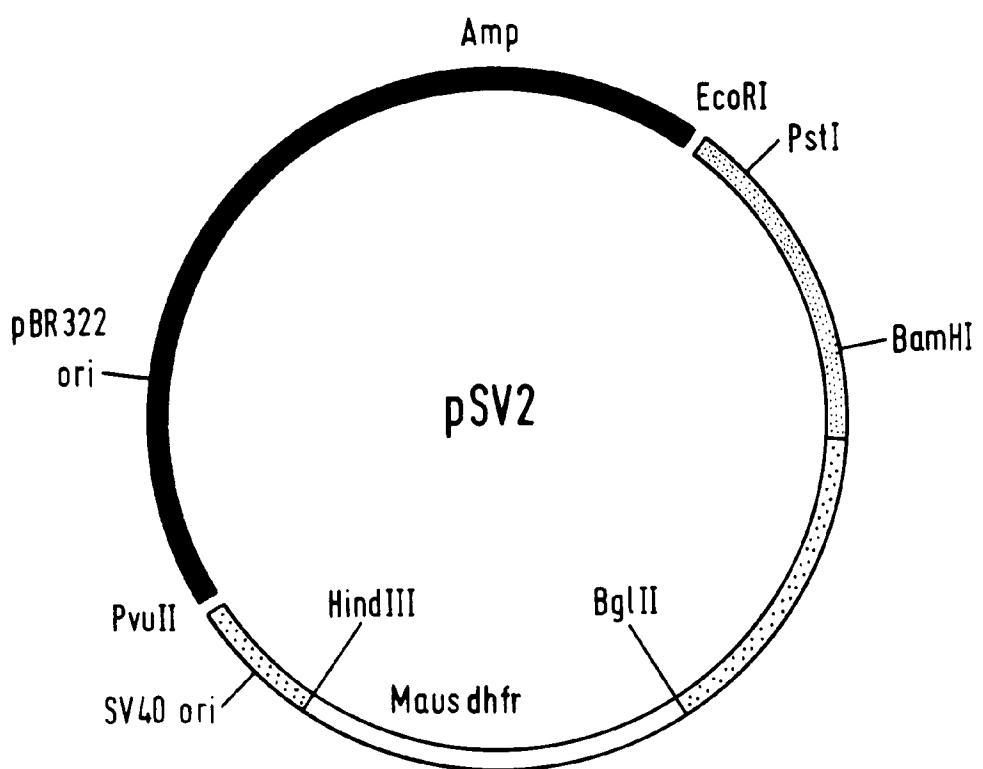


Fig. L

Fig. M

